تأثير تداخل خلات الخارصين مع الهايدروكورتزون على فاعلية الخلايا البلعمية

كوكب سليم نجم* وشيماء عبد القادر مهدي**

*قسم علوم الحياة/ كلية التربية/ جامعة تكريت

**كلية طب الأسنان/ جامعة تكريت

الخلاصة

صممت الدراسة الحالية لدراسة التغيرات الحاصلة في فاعلية خلايا البلعمة عند المعاملة بالهايدروكورتزون ومحاولة التخلص أو الحد من التاثيرات الجانبية للهايدروكورتزون باستعمال خلات الخارصين في الفئران المختبرية. وقد أظهرت نتائج الدراسة الحالية أن للهايدروكورتزون فعل تثبيطي لفاعلية خلايا البلعمة بينما على العكس فإن لخلات الخارصين لها تأثير محسن لفاعلية الخلايا البلعمية، وقد تم اخذ مجموعة من الحيوانات وكان عددها 24 فاراً قسمت إلى اربع مجاميع تحوي كل مجموعة على ست مكررات وكانت: المجموعة الأولى G1 مجموعة السيطرة جرعت بالمحلول الفسلجي لمدة 15 يوم. المجموعة الثانية G2 تم حقنها بالهايدروكورتزون (1 ملغم للفارة البالغة أذيبت في 0.1 مللیتر ماء مقطر يوميا) في العضلة ولمدة 15 يوم. المجموعة الثالثة G3 جرعت عن طريق الفم بخلات الخارصين (6.25 مايكرو غرام/ كغم/ يوم والتي تعادل 15 ملغم/ كغم/ يوم بالنسبة للإنسان) لمدة 15 يوم. المجموعة الرابعة G4 تم حقنها بالهايدروكورتزون في العضلة وجرعت عن طريق الفم بخلات الخارصين كما جاء في G3,G2.

The Effect of interaction of zinc acetate with hydrocortisone on Phagosytic Activity of Phagocyte Cells

K. S. Al-Kasiy* and Sh. A. A. Mahdy**

***Dep. Biology/ College of Education/ Tikrit University**

****College of Dentistry/ Tikrit University**

Abstract

This study was designed to study the changes that occur in the phagosytic activity of phagocyte cells during hydrocortisone treatment and an attempt was done to reduce or at least inhibit the side effects of hydrocortisone by using zinc acetate in laboratory mice. The results showed that hydrocortisone have inhibitory effects on the phagosytic activity of phagocyte cells while zinc acetate have a stimulatory effects on phagosytic activity of phagocyte cells and had been take group of mice 24 mice which divided in to four groups, each group contain 6 animal, as fallow: First group G1 (control group): This group was orally administrated with physiological saline for 15 days. Second group G2: This group was muscularly injected (i.m) with 6.25/microgram/kg/day of hydrocortisone for fifteen days. Third group G3: This group was orally administrated with zinc acetate (1 milligram dissolved in 0.1 milliliter of distal water) for fifteen days. The fourth group: This group was muscularly injected (i.m) with hydrocortisone similar to G2 and with zinc acetate similar to G3 for fifteen days.

المقدمة

تعد مركبات الستيرويدات (القشرانيات السكرية) من أكثر المركبات الكيمياوية التي لها علاقة مباشرة بتنظيم حياة الإنسان حيث أنها تنتشر في أكثر من مجال وبأكثر من مركب لتدخل في العديد من التفاعلات الأيضية(1، 2). إن استخدام عقار الهيدروكورتزون بجرعة عالية أو لوقت طويل يؤدي ذلك إلى حصول ضرر للنسيج(3). وقد وجد إن الخلايا البلعمية ممكن أن تتغير حساسيتها ومقاومتها للهيدروكورتزون وفقا لمرحلة التطور وموقع

العضو(4) حيث يثبط الهيدروكورتزون فعالية النقل الخلوي ويؤثر في التركيب الجزيئي الدقيق للخلية إذ يسبب تنكس النواة مما يؤدي إلى تحلل الخلية(5) ويثبط انقسام الخلية Cell division (6) وفعالية البلعمة Phagocytosis بوساطة تخفيف امتصاص المستضد ويسبب انخفاض في تصنيع الحامض النووي منقوص الأوكسجين Deoxy ribo nucleic acid (DNA) ويؤثر في تركيب البروتين والاستقرار الخلوي وتحت الخلوي للأغشية، ويؤدي إلى موت الخلايا المبرمج غالبية الخلايا اللمفاوية في الأعضاء اللمفاوية كالطحال والعقيدات اللمفاوية والذي يؤدي إلى إمكانية نقص في الجهاز المناعي(7، 8). يلعب الخارصين دورا مهما في وظائف الجهاز المناعي سلبا أو إيجابا وحُسب تركيزه في الغذاء أو حسب جرعته عند إعطائه كعلاج . فقد أشار(9) إلى أن النقص الطفيف في الخارصين ممكن أن يؤدي إلى تقليل إنتاج وإفراز هرمونات غدة التوثة وتقليل الخلايا اللمفاوية نوع CD4 وإحداث ضرر في وظائف هذه الخلايا التائية والخلايا القاتلة الطبيعية وخلايا العدلات(10). تمثل البلعمة الخط الدفاعي الخلوي في المناعة اللانوعية، حيث يتم ابتلاع وهضم وقتل الجراثيم والمواد الغريبة بمسالك كيميائية عديدة داخل مجموعة من خلايا الدم البيض والتي تسمى الخلايا البلعمية Phagocytes (11). تبدأ البلعمة بهجرة الخلايا إلى موقع الإصابة بالانجذاب الكيميائي Chemotaxis (12). وعند وصول الخلايا البلعمية إلى مواقع الجراثيم فإنها تقوم بالتهامها بعد أن تحقق اتصال معها عن طريق عوامل الطاهية Opsonins مثل C3b وIgG (13). ونظرا لأهمية استخدام عقار الهايدروكورتزون في العلاجات الطبية ولما له من اثر مهم في إنقاص مناعة الجسم استهدفت الدراسة الحالية محاولة تقليل التأثيرات الجانبية للهايدروكورتزون في عملية البلعمة باستخدام الخارصين كمحفز وذلك بدراسة ما يلي: تأثير الهايدروكورتزون وتأثير الخارصين في عملية البلعمة. تأثير المعالجة باستخدام خلات الخارصين مع الهايدروكورتزون في عملية البلعمة.

المواد وطرائق العمل

استخدم في هذه التجربة 24 حيوان مختبري من الفئران البيض، تم الحصول على الحيوانات من البيت الحيواني التابع لكلية العلوم بجامعة بغداد، وتمت عملية التربية في غرفة مسيطر على ظروفها تقريباً وتحتوي على عدد من الرفوف والمناضد للتأكد من عدم وضع أقفاص التربية على الأرض مباشرةً. هذا وقد كانت الغرفة مكيفة وبدرجة حرارة حوالي 25 درجة مئوية وبدورة ضوئية 12 ساعة ضوء و12 ساعة ظلام خلال اليوم. وكانت هذه الغرفة في المنزل لضمان تلك الظروف. وكانت جميع الحيوانات المستخدمة في التجربة بنفس الوزن وتم تقسيمها لأربع مجاميع تحوي كل مجموعة على 6 مكررات ونشمل المجاميع التالية: المجموعة الأولى G1 مجموعة السيطرة جرعت بالمحلول الفسلجي لمدة 15 يوم. المجموعة الثانية G2 تم حقنها بالهايدروكورتزون في العضلة ولمدة 15 يوم.المجموعة الثالثة G3 جرعت عن طريق الفم بالخارصين لمدة 15 يوم. المجموعة الرابعة G4 تم حقنها بالهايدروكورتزون في العضلة وجرعت عن طريق الفم بالخارصين لمدة 15 يوم.

- **تحضير الحبر الهندي**: استنادا إلى ما جاء في Junqueira (14) من أن استخدام الحبر الهندي يؤدي إلى اصطباغ خلايا البلعمة إذ انه يعتمد مستضدا Antigen وعلى هذا الأساس تم تصميم هذه التجربة لدراسة فعالية خلايا البلعمة. حيث تم وزن 1 غرام من مسحوق الحبر الهندي بالميزان الحساس ومن ثم أذيب في 100 مللتر ماء مقطر Distal water.
- **تحضير صيغة كمزا:** وزن 1 غرام من مسحوق الصيغة بالميزان الحساس ومن ثم أذيب في 100 مللتر ماء مقطر Distal water حيث تم وضع الصبغة على الشريحة الزجاجية لمدة أربع دقائق ثم غسلت بالماء المقطر Distal water (15).

- **تحديد الجرعات:** لقد تم اختيار الجرعة من مادة خلات الخارصين (تم استخدام خلات الخارصين النقية) وكانت 15 ملغم/ كغم/ يوم بالنسبة للإنسان واعتبرت هذه الجرعة هي الجرعة العلاجية وذلك اعتماداً على الأدوية الموجودة في الصيدليات المحلية وحسب ما مثبت على كل من عقار Centrum الأمريكي الصنع والمنتج من قبل شركة American Cyaramid Co. U.S.A. ، عقار Gluvit والمنتج من قبل شركة HENS الألمانية بالإضافة إلى عقار Cenvita الصيني المنشأ والمنتج من شركة Shanxi Shugnaug Pharma. Co. Ltd. (وزن الحيوان الواحد المستخدم في التجربة 20 غرام). أما بالنسبة لعقار الهيدروكورتزون فقد تم حقن 1 ملغم للفارة البالغة أذيبت في 0.1 ملليتر ماء مقطر يوميا ولمدة 15 يوم(16). وبعد انتهاء مدة المعاملة في كل المجاميع (G4,G3,G2,G1) في اليوم الرابع عشر وقبل التشريح بيوم واحد، حقنت جميع الحيوانات في اليوم الرابع عشر بمادة الحبر الهندي (1 ملليتر من تركيز 1%) بالوريد عن طريق الذيل وفي اليوم الخامس عشر وقبل التشريح بنصف ساعة تم حقن الحيوانات بالغشاء البريتوني بمادة الحبر الهندي (2 ملليتر من تركيز 1%) وتم تدليك المنطقة ليتم انتشار الصبغة ثم تم جمع السائل البريتونى قيل التشريح مباشرةً وعمل مسحات منه على الشرائح الزجاجية، وبعد أن تركت لتجف تم صبغها بصبغة گمزا Gemza stain لتصبيغ الخلايا البلعمية ومن ثم تم فحصها بالمجهر الضوئي وتعدادها ومقارنة فعاليتها بعد أن تم التعداد باختيار حقول عشوائية ومن ثم تم اخذ النسبة المئوية لكل الخلايا البلعمية والخلايا الموجودة في السائل البريتوني ومقارنة هذه النسب(17).
- **التحليل الإحصائي:** تم استخدام كل من اختبار T واختبار مربع كاي للكشف عن الفروق المعنوية بين المجاميع التجريبية عند مستوى معنوية 0.01.

النتائج

أظهرت نتائج فحص السائل البريتوني لجميع المجاميع الحيوانية وجود الخلايا الأتية: الخلايا اللمفاوية، الخلايا البلازمية، الخلايا البلعمية والتي شملت: البلعم الكبيرMacrophage، الخلايا وحيدة النواة Monocytes، الخلايا العدلة Neutrophiles وقد تباينت نسبة وجودها وفعاليتها في السائل البريتوني بين المجاميع التجريبية. صنفت فعالية خلايا البلعمة نسبة إلى وجود عدد الحبيبات السوداء Black dot والتي تمثل دقائق الحبر الصيني الملتهمة من قبل خلايا البلعمة إلى غير فعالة (تحوي 1-2 Black dot) ومتوسطة الفعالية (تحوي من 3-5 Black dot) وعالية الفعالية (تحوي>5 Black dot) مؤشرةَ بذلك على فاعلية خلايا البلعمة الصور (1، 2، 3، 4). تشير النتائج الموضحة في الجدول (1) إلى أن فاعلية خلايا البلعمة في المجاميع التجريبية قد انخفضت معنوياً ($p\leq0.01$) في أعدادها في مجموعة الحيوانات المعاملة بالهايدروكورتزون G2 عند مقارنتها بما هي عليه في مجموعة السيطرة وعلى العكس فقد أظهرت النتائج حصول زيادة معنوية ($p\leq0.01$) في أعداد خلايا البلعمة في المجموعتين G4, G3 فضلا عن زيادة الحبيبات الملتهمة في سايتوبلازم خلايا البلعمة عند لمجموعتين G4, G3 عند مقارنتها بمجموعة G2 التي أظهرت نقصان بأعداد الحبيبات الملتهمة.

جدول (1) معدل أعداد خلايا البلعمة في المجاميع التجريبية المعاملة بالهايدروكورتون والخارصين ومجموعة السيطرة (عدد الحيوانات 24)، (n=6)

المجاميع	معدل أعداد خلايا البلعمة +SE			خلايا لمفاوية	خلايا بلازمية	خلايا حمضية
	غير فعالة	متوسطة الفاعلية	عالية الفاعلية			
G1	5.167 + 0.477 b	11.667 + 0.760 cd	68.333 + 0.989 b	14.833 + 0.401 b	- d	- b
G2	40.17 + 1.66 a	16.667 + 0.843 b	14 + 0.816 e	26.333 + 0.803 a	1.167 + 0.543 c	- b
G3	2.500 + 0.645 c	12 + 0.816 c	72.17 + 1.30 a	14.167 + 0.792 b	- d	- b
G4	4.667 + 0.211 bc	23 + 0.931 a	42.5 + 0.764 d	9.833 + 0.307 c	10.333 + 0.333 a	9.5 + 0.342 a

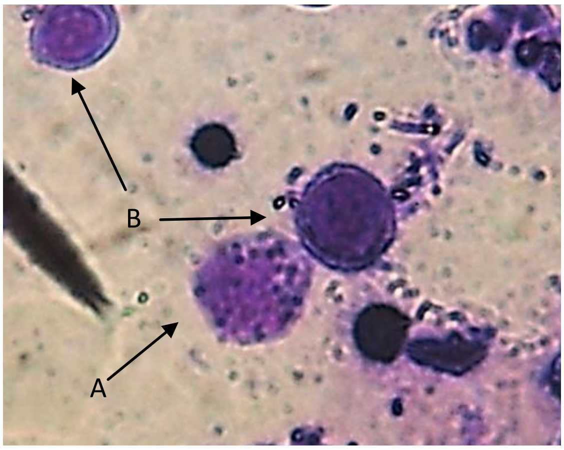
الحروف المختلفة تعني وجود فروق معنوية عند مستوى 0.01.

G1 مجموعة السيطرة جرعت بالمحلول الفسلجي لمدة 15 يوم.

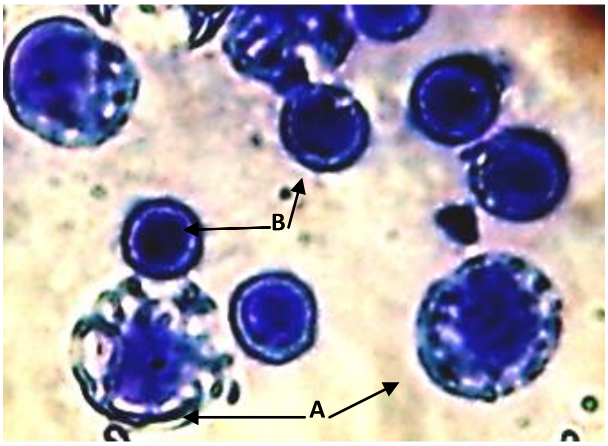
G2 مجموعة الحيوانات التي تم حقنها بالهايدروكورتزون في العضلة ولمدة 15 يوم.

G3 مجموعة الحيوانات التي جرعت عن طريق الفم بالخارصين لمدة 15 يوم.

G4 مجموعة الحيوانات التي تم حقنها بالهايدروكورتزون في العضلة وجرعت عن طريق الفم بالخارصين لمدة 15 يوم.

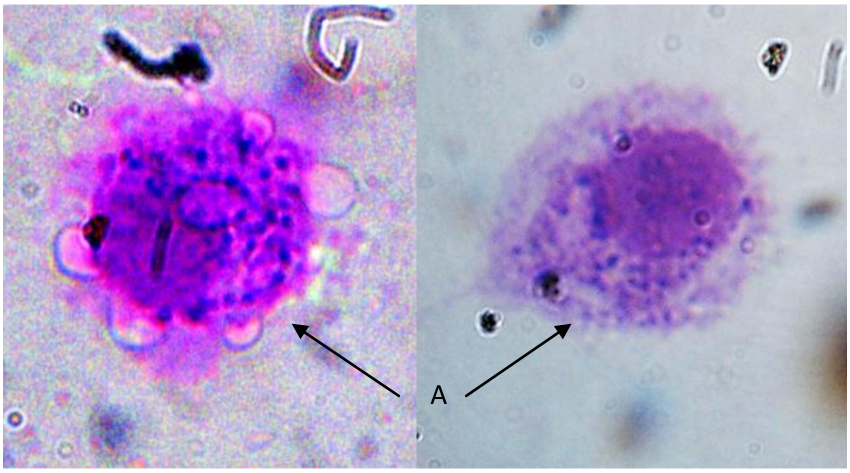


صورة(1) فاعلية خلايا البلعمة في مجموعة G1 (مجموعة السيطرة جرعت بالمحلول الفسلجي لمدة 15 يوم) لونت بملونة كَمزا البلعم الكبير A، خلية لمفية B، قوة التكبير 400 X



صورة(2) فاعلية خلايا البلعمة في مجموعة G2 (مجموعة الحيوانات التي تم حقنها بالهايدروكورتزون في العضلة ولمدة 15 يوم)، لونت بملونة كَمزا. البلعم الكبير A، خلية لمفية B، قوة التكبير 400 X

صورة(3) فاعلية خلايا البلعمة في مجموعة G3 (مجموعة الحيوانات التي جرعت عن طريق الفم بالخارصين لمدة 15 يوم) لونت بملونة كَمزا، البلعم الكبير A. قوة التكبير 400 X.



صورة(4) فاعلية خلايا البلعمة في مجموعة G4 (مجموعة الحيوانات التي تم حقنها بالهايدروكورتزون في العضلة وجرعت عن طريق الفم بالخارصين لمدة 15 يوم)، لونت بملونة كَمزا، البلعم الكبير A. قوة التكبير 400 X

المناقشة

أن النتائج التي لوحظت من خلال المعاملة بالهادروكورتيزون من نقصان أعداد خلايا البلعمة ونقصان فاعليتها قد يعود إلى وجود مستلمات سطحية للهايدروكورتزون على سطوح خلايا البلعمة حيث أظهرت الدراسات إن التعرض الطويل للهايدروكورتزون يغير فاعلية خلايا البلعمية (18). وأيضا ممكن ان يؤدي الهايدروكورتزون إلى خفض أعداد الخلايا البلعمية Phagocytic ويحطم قابلية القتل فيها (19). وتعد خلايا البلعمة من الخلايا الهدف لفعل الهايدروكورتزون الذي يتم من خلال مستقبلات خاصة (20). كما يحث الهايدروكورتزون على حصول تغيير في وظائف الخلايا وحيدة النواة Monocyte (21). ولقد وجد إن الموت المبرمج apoptosis في الخلايا وحيدة النواة عند المعاملة بالهايدروكورتزون يعتمد على الوقت والجرعة المعتمدة على الطريقة بالإضافة إلى أن العديد من الخلايا وحيدة النواة وخلايا الحمضة تنخفض عند المعاملة به نتيجة إعادة توزيع الخلايا(22). ويؤثر الهايدروكورتزون في انقسام ووظيفة الخلايا الصارية Mast cell إذ يعمل على خفض عددها ويسبب تلف تدريجي في وظيفتها (23). أما المعاملة بالخارصين فقد أدت إلى حصول زيادة معنوية في أعداد خلايا البلعمة وفي فاعليتها حيث لوحظ زيادة الحبيبات الملتهمة من قبل خلايا البلعمة عند المقارنة مع مجموعة السيطرة وهذا يجعلنا نعتقد إن التأثير الحاصل قد يكون عن طريق وجود مستلمات للخارصين على سطوح خلايا البلعمة وقد أشار Rink and Gabriel (24) إلى أن للخارصين تأثر في إنزيمات خلايا البلعمة حيث يقوم بزيادة فاعليتها للبلعمة فضلا عن زيادة قدرتها في الدفاع عن الجسم. وعند المجموعة المعاملة بالهايدروكورتزون والخارصين معا فقد سجلت النتائج حصول زيادة معنوية بأعداد خلايا البلعمة مقارنة بما هو عليه في المجموعة المعاملة بالهايدروكورتزون وهذا يجعلنا نعتقد ان للخارصين أثر مهم في تثبيط فعل الهايدروكورتزون أو الحد من تأثيراته السلبية وذلك بتحفيز خلايا العدلات لزيادة فاعليتها البلعمية الذي أكده الباحث Thurmham (25) ذلك من خلال تأثيره في جدارها الخلوي مما يؤدي إلى زيادة قدرتها على البلعمة من خلال تحفيزه لإنتاجها العوامل الخلوية ونلاحظ أيضا في هذه المجموعة زيادة أعداد الخلايا الحامضية وهذا يجعلنا نعتقد ان خلات الخارصين قد حفزت هذه الخلايا للتغلب على الفعل السلبي للهايدروكورتزون من خلال تحفيز الخلايا للانقسام وبالتالي إفراز الهستامين الذي يساعد على توسيع الأوعية الدموية في مناطق الإصابة للمساعدة على ورود بقية الخلايا البلعمية لإتمام عملها في تلك المناطق(26). من خلال نتائج الدراسة الحالية نستطيع التوصل إلى أن للخارصين أثر مهم في زيادة فاعلية خلايا البلعمة أو الحد من تأثيرات فعل الهايدروكورتزون السلبية.

المصادر

1. Asmis, R. & Jelk, J. (2000). Vitamin E supplementation of human macrophages prevents neither foam cell formation nor increased susceptibility of foam cells to lysis by oxidized LDL. Vasc. Biol., 20: 990-997.
2. Bertram, G. K. & Antbony, J. T. (1998). Examination and Board Review Pharmacology. Print United States of America university of California, San Francisco. PP. 88-162.
3. Bowers, J. M. (2002). Nutrition and immunity: You are what you eat. ACRIA Update, 11(2).
4. DeGroot, L. J. & Jameson, J. L. (2001). Endocrinology, 4th ed. Churrchill, Livingstone, London, PP. 697-712.
5. Duval, D.; Homo, F.; Fournier, C. & Dausse, J. P. (1979). Glucocorticoid receptors in mouse spleen cell subpopulation. Cell. Immunol., 46(1): 1-11.
6. Fraker, P. J.; King, L. E.; Laakko, T. & Volmer, T. L. (2000). The dynamic link between the integrity of the immune system and zinc status. J. Nutr., 130(55suppl): 139-406.
7. Fortes, C. (1998). Zinc boosts, vitamin A dampens immunity. J. Am. Geriatrics Soc., 46:19-26.

8. Hughes, D. A. (1999). Effects of carteniods on human immune function. Proc. Nutr. Soc., 58:713-718.
9. Lesourd, B. M. (1997). Nutrition and immunity in the elderly modification of the immune response with nutritional treatment. Am. J. Clin. Nutr., 66(2): 4785-4845.
10. Maruyama, S.; Minagawa, M.; Shimizu, T.; Oya, H.; Yamamoto, S.; Musha, N.; Abo, W.; Weerasinghe, A.; Hatakeyama, K. & Abo, T. (1999). Administration of glucocorticoids Markedly increases the numbers of geranulocytes and extrathymic T cells in the bone marrow. Cell. Immunol., 194: 28-35.
11. Petranyi, G.; Benczur, M. & Alfoldy, P. (2011). The effect of single large dose hydrocortisone treatment on IgM and IgG antibody production, morphological distribution of antibody producing cells and immunological memory. Immunol., 21(1):151-158.
12. Yu, I. & Shilov, D. V. L. (2001). Effects of Hydrocortisone on Peritoneal Phagocytizing Cells in Rats under Conditions of β-drenoceptors Blockade. Bulletin of Experim. Biol. Med., 132 (4): 987-989.
13. Thompson, E. B. (1995). Apoptosis and steroid hormones. Mol. Endocrinol., 8:665-673.
14. Junqueira, L. C. & Jose, C. (2005). Basic Histology text and atlas. 11 ed. PP: 257-262.
15. Allen, J. W.; Shuller, C. F.; Mendes, R. W. & Latts, S. A. (1997). A simplified technology for in vivo Analysis of Sister. Chromatid Exchange using S-bromodeoxy-Uridin Tablets Cytogen., 18:231-237.
16. Homo, F.; Duval, D.; HatzFeld, J. & Evrard, C. (2003). Glucocorticoid sensitive and resistant cell populations in the mouse thymus. J. Steroid Biochem., 13(2):135-143.
17. Girdon, S. (1999). Fundamental immunology. ed. Pau 1,W (Lippinctt-Raven. New York), PP. 533-545.
18. Fudenberg, H. H.; Stites, D. P.; Caldwell, J. L. & Well, G. V. (1998). Basic and Clinical immunology. 2nd Ed. Middle East Edition. California. Lebanon. PP: 311-316.
19. Goldsby, A. R.; Kindt, J. T. & Osbome, A. B. (1999). Immunology. 4thEd. W. H. Freeman and company. New York. PP:412-527.
20. Schleimer, R. P.; Jacoues, A.; Shin, H. S.; Lichtenstein, L. M. & Plaut, M. (2001). Inhibition of T cell-mediated cytotoxicity by anti-inflammatory steroids. J. Immunol., 132(3):269-273.
21. Cupps, T. R.; Edgar, L. C.; Thomas, C. A. & Fauci, A. S. (2002). Multiple Mechanisms of B cell immunoregulation in man after administration of in vivo corticosteroids. J. Immunol., 132(1):170-175.
22. Schmidt, M.; Pauels, H. G.; Liigering, N.; Liigering, A.; Domschke, W. & Kucharzik, T. (1999). Glucocorticoid induce apoptosis in human monocytes: Potential role of IL-IB. J. Immunol.,136(6):3488-3490.
23. Sakai, H.; Toyota, N; Ito, F.; Takahashi, H.; Hashimoto, Y. & Lizuka, H. (1999). Glucocorticoids inhibit proliferation and adhesion of the IL-3-dependent mast cell line, Mc9, to NIH/3T3Fibroblasts, with an accompanying decrease in IL-3 receptor expression. Arch. Dermatol. Res., 291:224-231.
24. Rink, L. & Gabriel, P. (2000). Zinc and the immune system Proc. Nutr. Soc. Nov., 59(4): 541-552.
25. Tolonen, M. (2002). Folic acid and Zinc improve sperm quality Fertility and Sterility: 77:491-498. File//A: folic acid and zinc improve sperm quality. htm.
26. Chavakis, T.; May, A. E.; Prissner, K. T. & Kanses, M. (1999). Molecular mechanism of zinc-dependent leukocyte adhesion involving urokinase receptor and B2-integrins. Blood, 93(9): 1-2976-2983.